


L'hétérogénéité des populations microbiennes affecte l'efficacité des bioprocédés

Mise en ligne de la cytométrie en flux pour l'optimisation des bioprocédés

Frank Delvigne
Université de Liège, Gembloux Agro Bio Tech
Passage des Déportés, 2
5030 Gembloux BELGIUM
F.Delvigne@ulg.ac.be

1. Introduction

Evolution des technologies de fermentation



Fermentation naturelle par des micro-organismes
(acétique, alcoolique ou lactique)

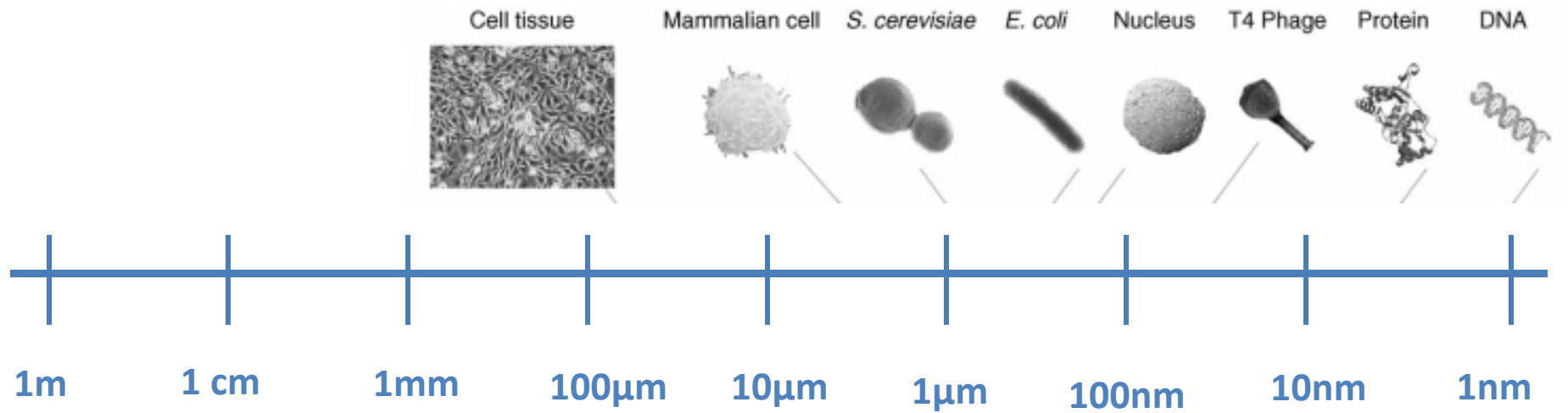
Production de métabolites primaires (acides, alcools,...)

Production de métabolites secondaires
(antibiotiques, polysaccharides, arômes,...)

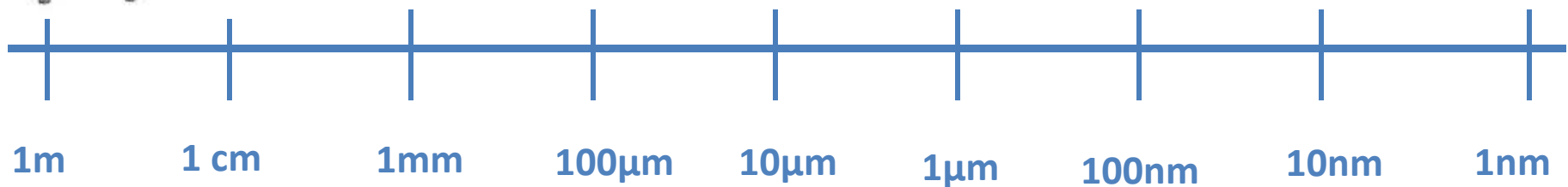
Production d'enzymes (amylases, cellulases, lipases,...)

Production de protéines recombinantes
(fragments d'anticorps, insuline humaine,...)

Maîtriser la biologie...

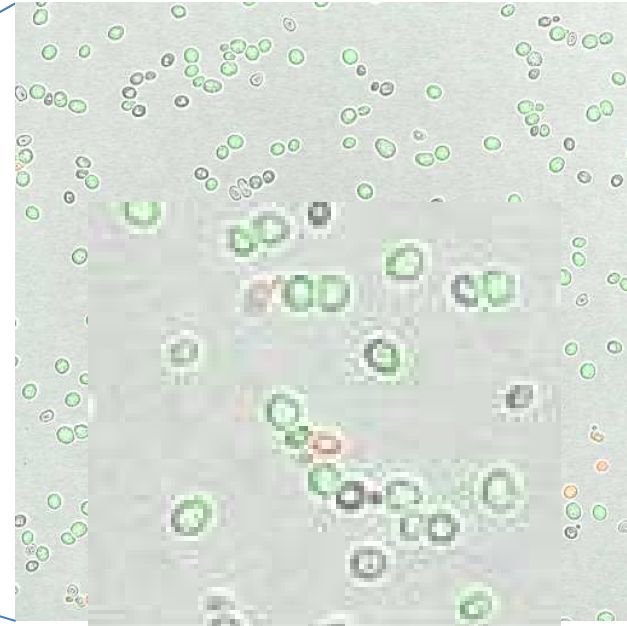


... dans des systèmes de culture industriels



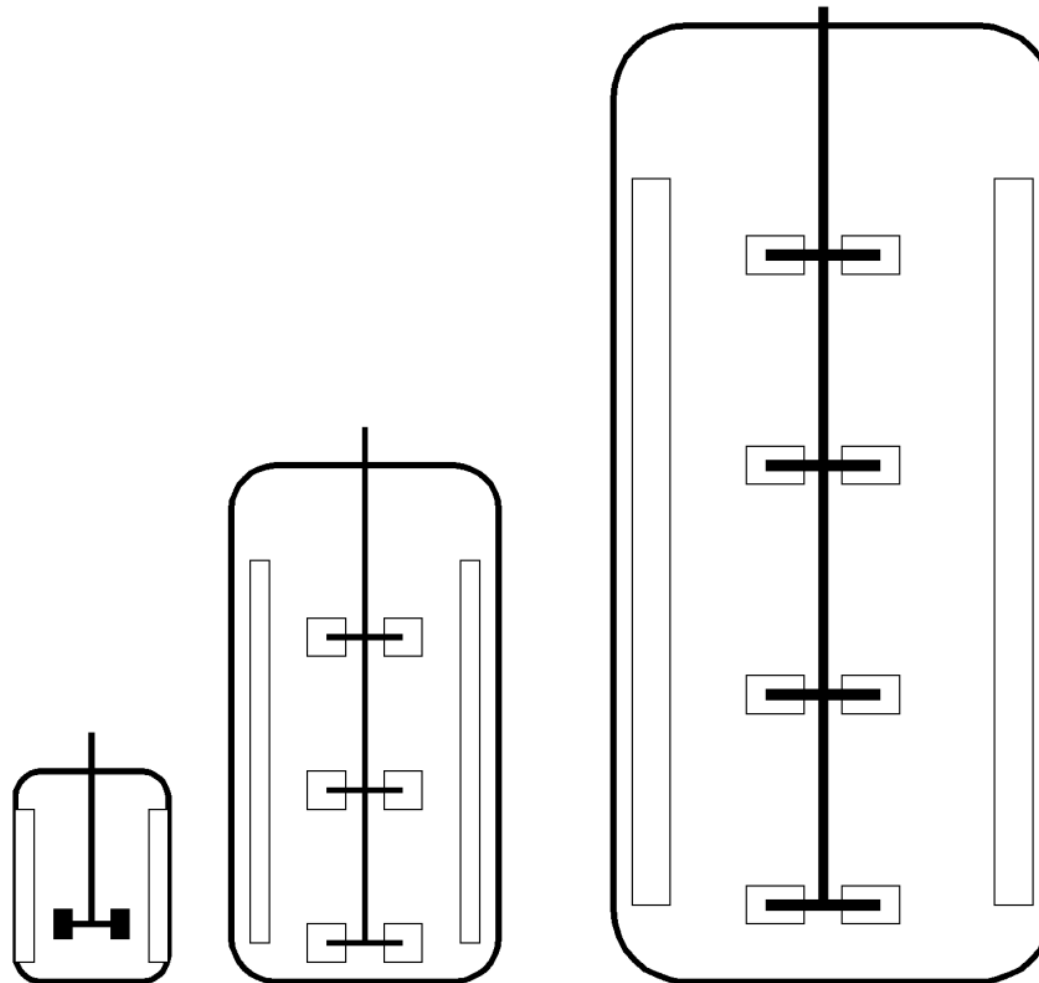


Système physique : bioréacteur

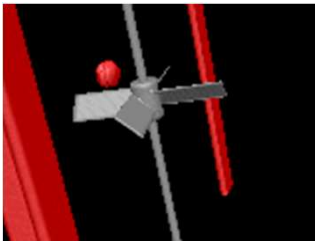


Système biologique : population microbienne

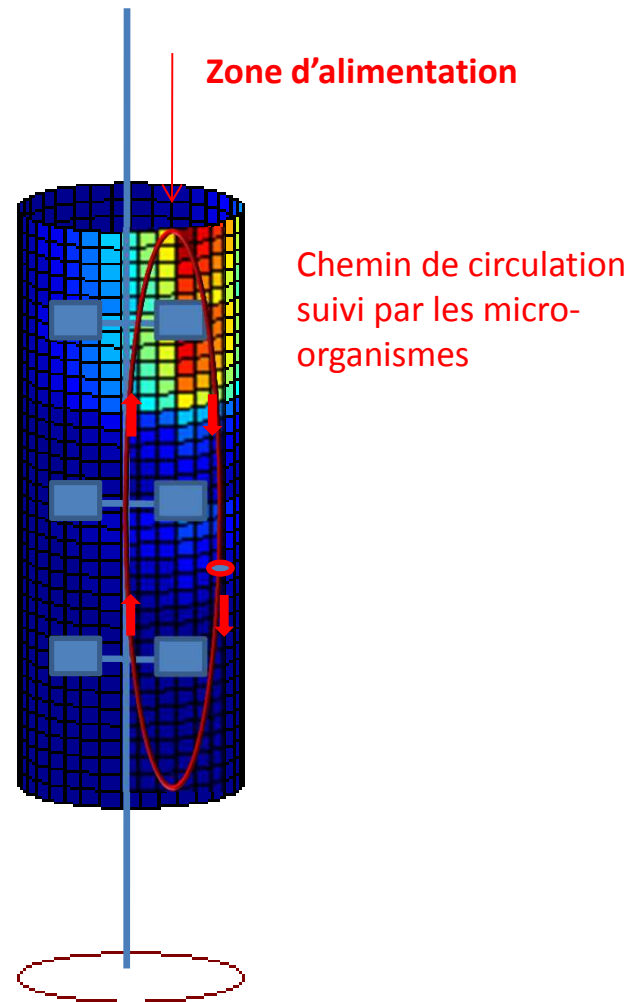
2. Système physique : Facteurs externes d'hétérogénéité



Exemple : simulation de l'homogénéisation d'une pulsation de glucose dans un bioréacteur à trois étages d'agitation

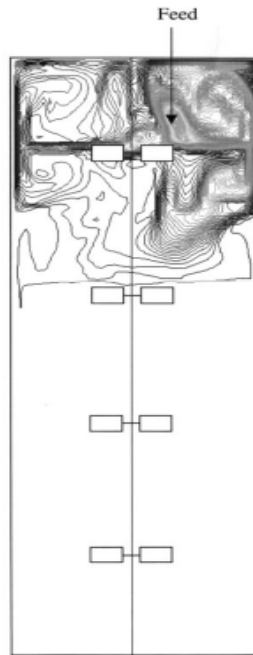


Bakker [2000]



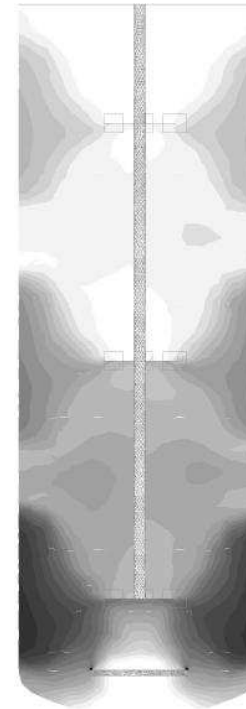
Problèmes associés au *scale-up*

Gradient de substrat dans les procédés *fed-batch*



Enfors *et al.* [2001] Journal of
biotechnology

Gradient en oxygène dissous dans les procédés aérobies

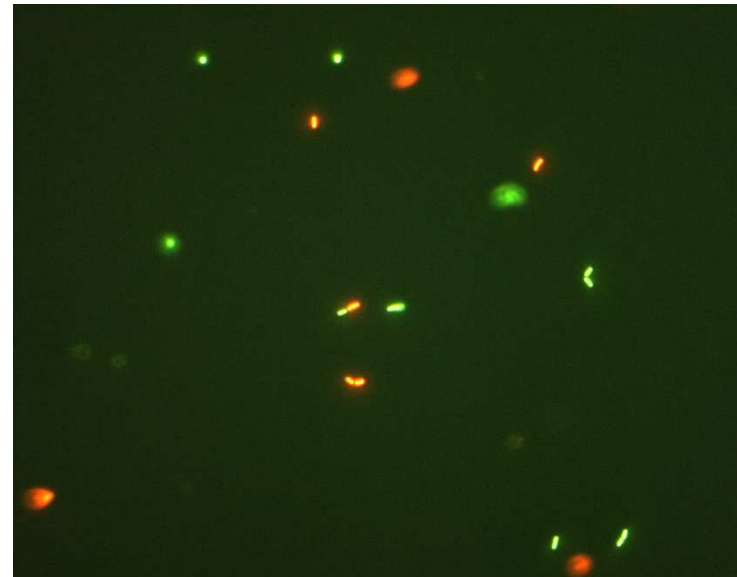
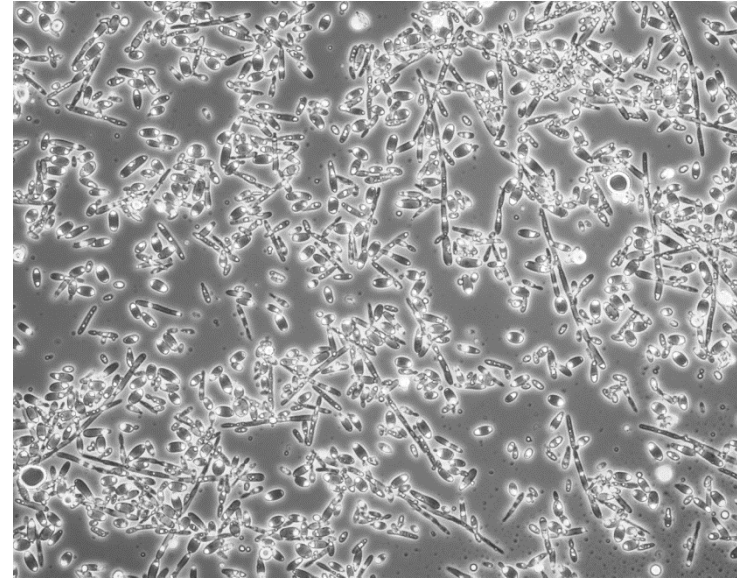


Schütze *et al.* [2006] 12th
European Conference on Mixing

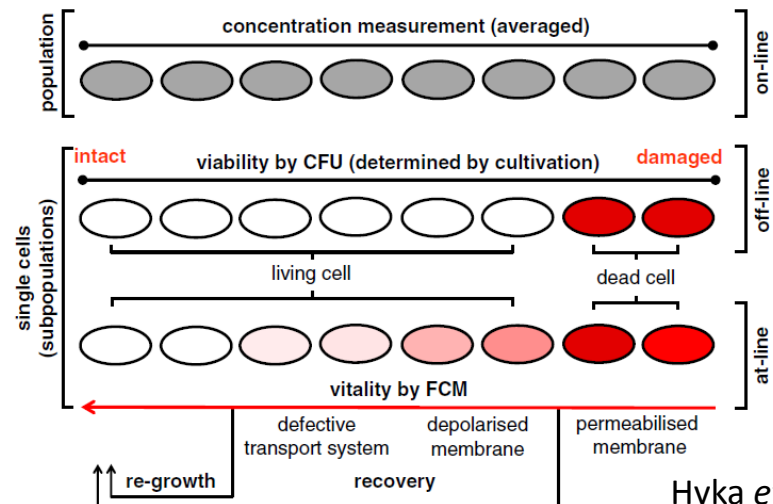
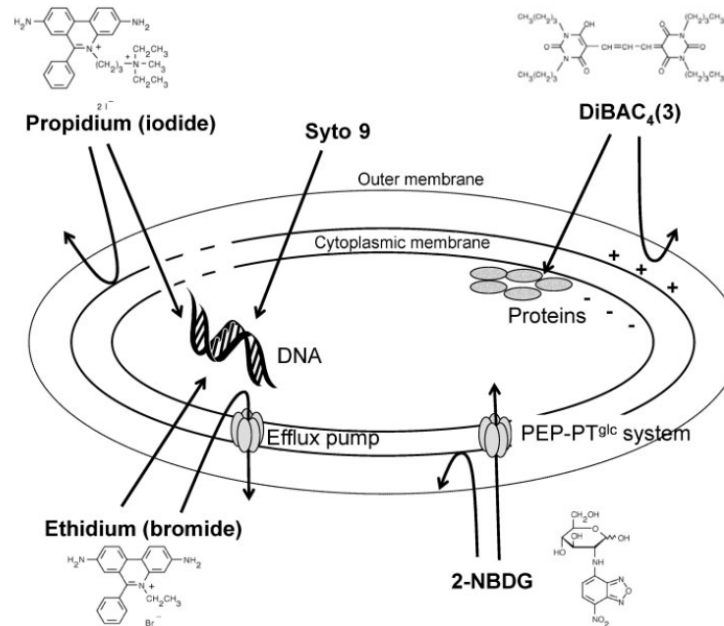
3. Système biologique : Facteurs internes d'hétérogénéité

Hétérogénéité au niveau :

- Morphologie
- Viabilité
- Production de métabolites/protéines
- Qualité des protéines



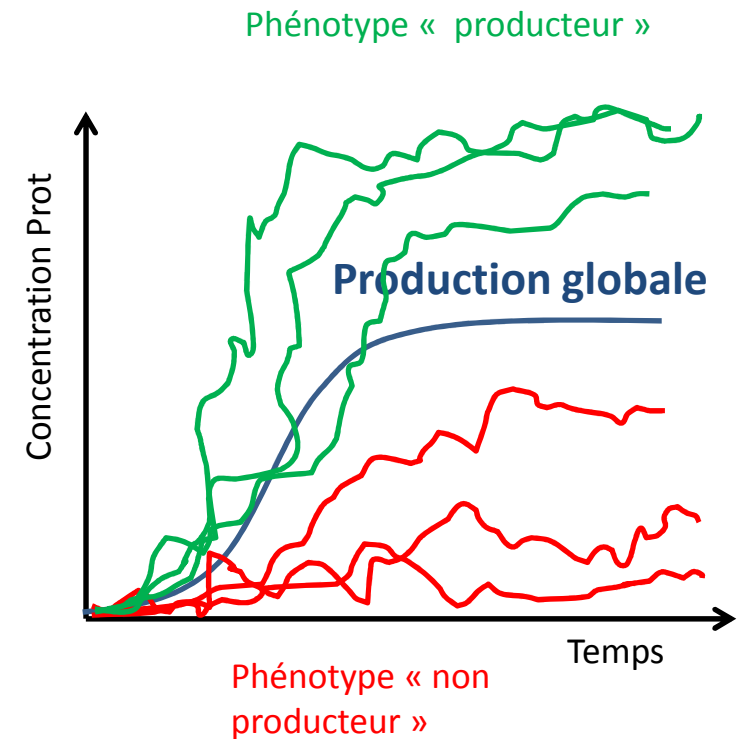
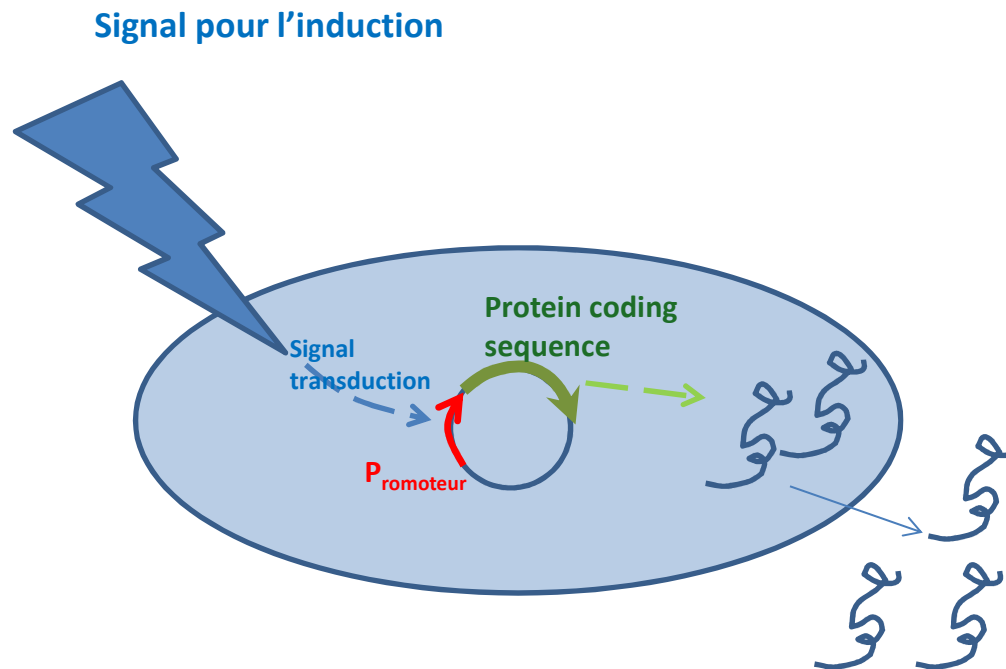
Biomarqueurs (externes) disponibles en microbiologie industrielle



Hyka *et al.* [2013]

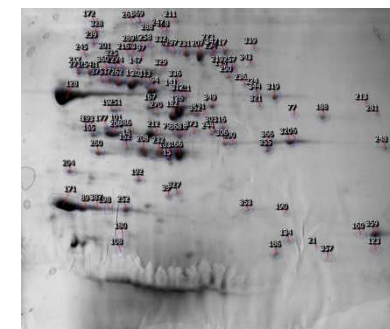
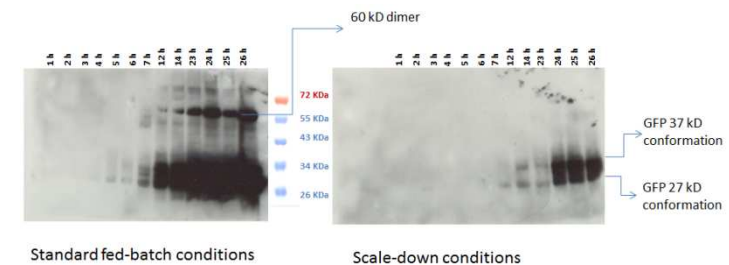
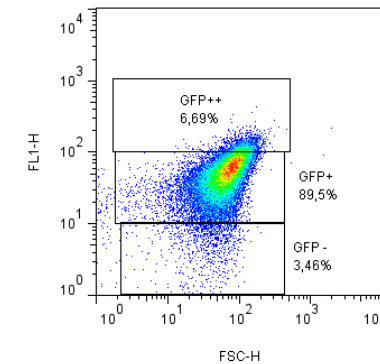
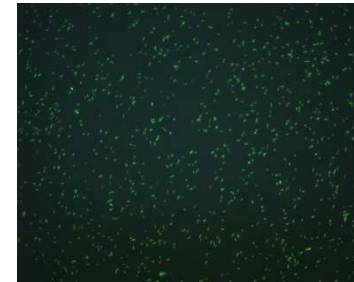
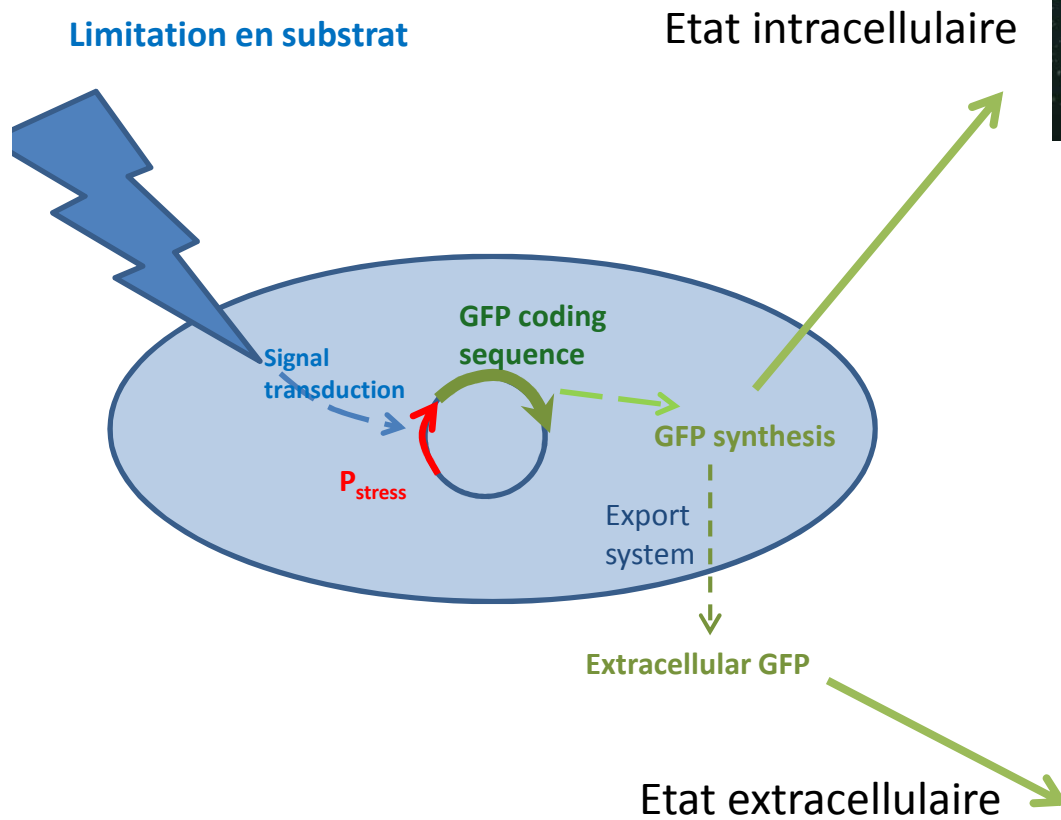
Hétérogénéité des systèmes recombinantes

Système recombinant

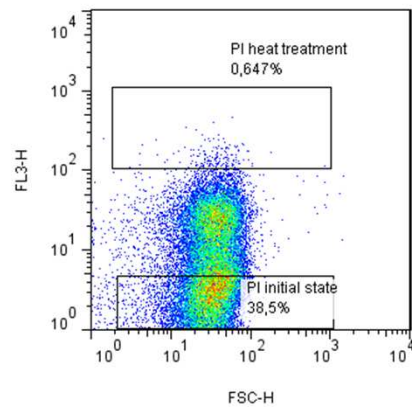
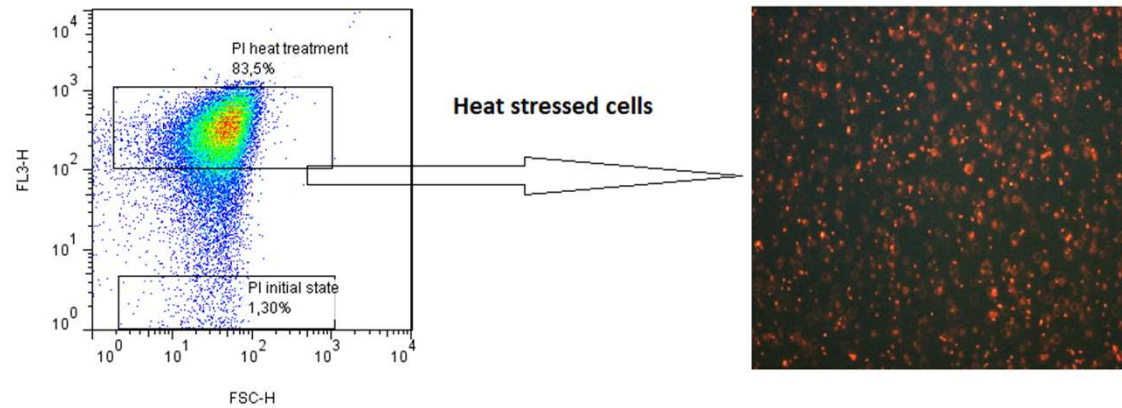


L'hétérogénéité microbienne est dynamique au cours d'un procédé : les cellules passent continuellement d'un état producteur à un état non producteur

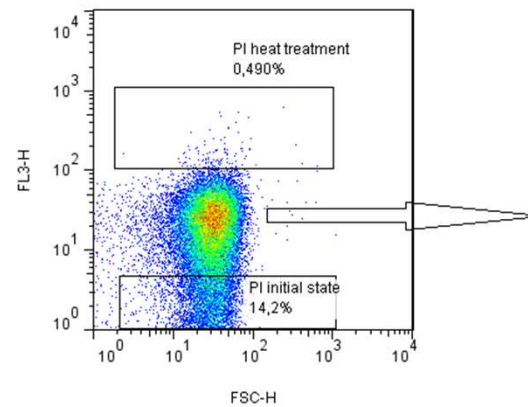
4. Exemples d'utilisation de la cytométrie en flux en microbiologie industrielle



Combinaison avec le test d'exclusion à base de l'iodure de propidium

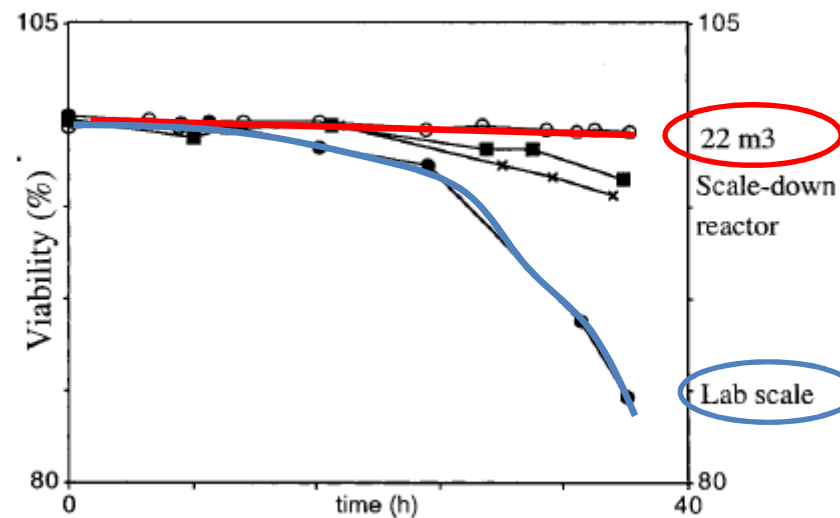


Chemostat D = 0.02 h⁻¹ (7h)



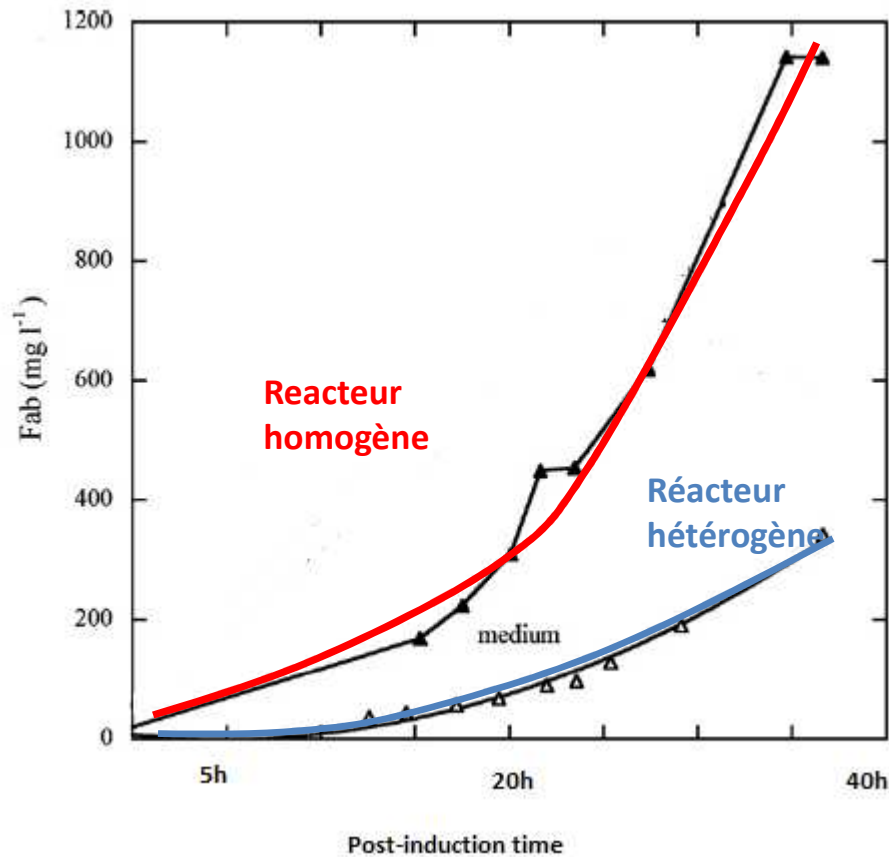
Chemostat D = 0.02 h⁻¹ (72h)

Phénomène moins connu : les fluctuations extracellulaires rencontrées dans les bioréacteurs industriels ont un effet bénéfique sur la viabilité cellulaire
Résultats comparatifs obtenus par le test d'exclusion de l'iodure de propidium



Enfors *et al.* [2001] *J. Biotech*, **85**, 175-185

Les fluctuations environnementales affectent également le relargage de protéines



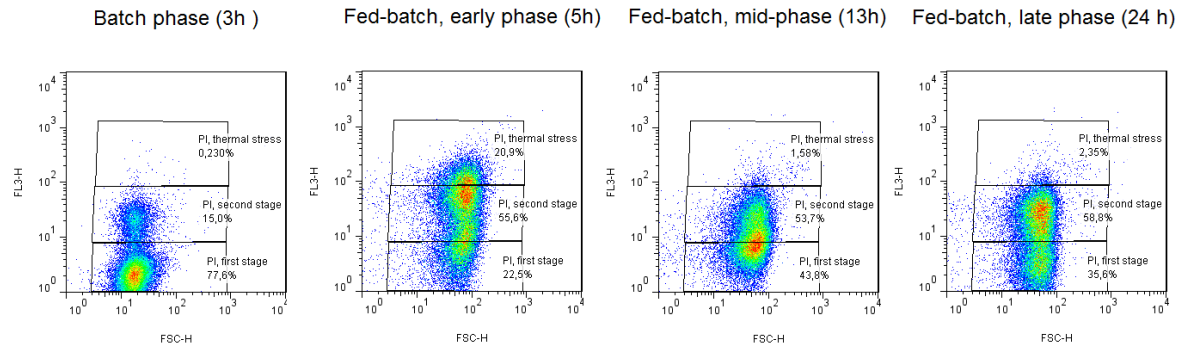
Le phénomène est à mettre en relation avec la perméabilité de la membrane cellulaire et la viabilité

Bäcklund *et al.* [2008] *J. Biotech*, **135**, 358-365

Essais avec le système rapporteur GFP

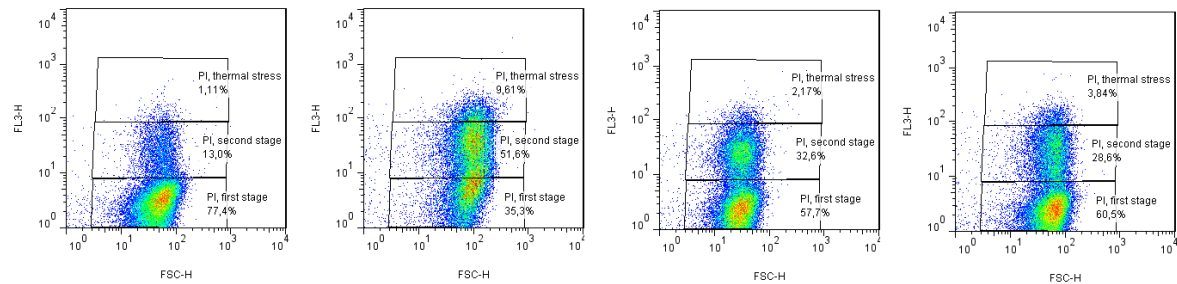
Test d'exclusion à l'IP

Réacteur
homogène



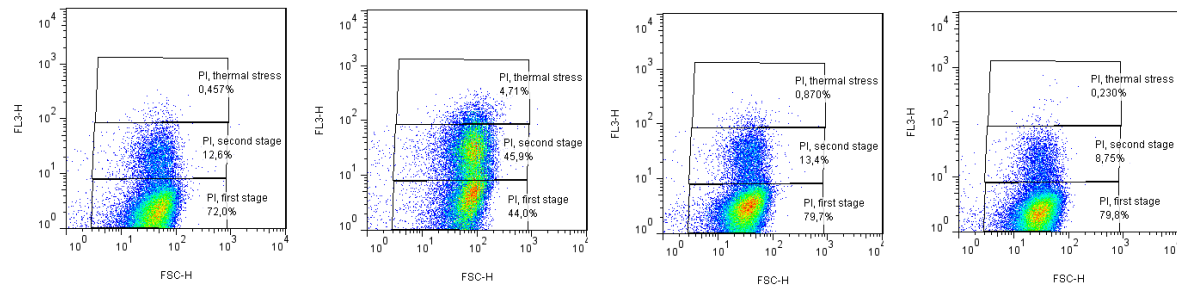
A

SDR réacteur
 $t_R = 38s$



B

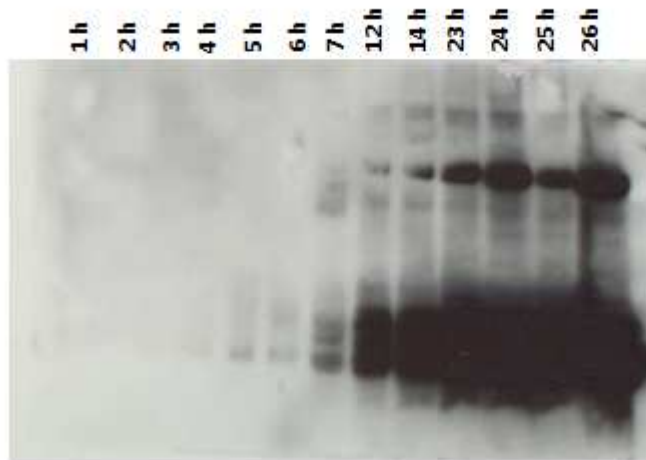
SDR réacteur
 $t_R = 79s$



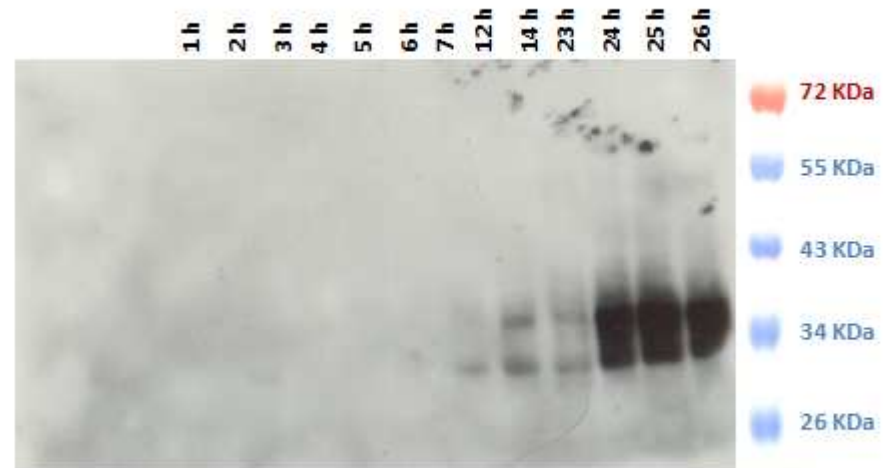
C

Mise en évidence de la GFP extracellulaire (western blot réalisé à partir des surnageants de culture)

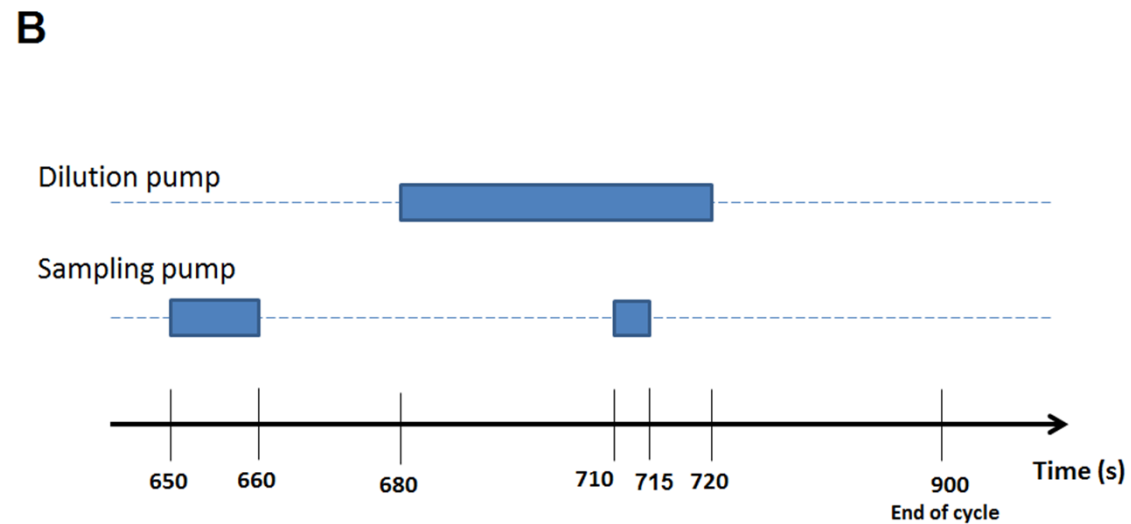
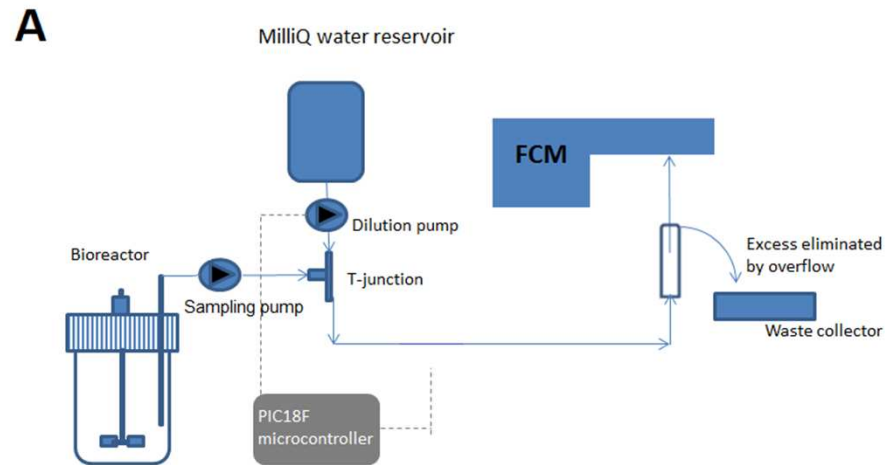
Réacteur homogène



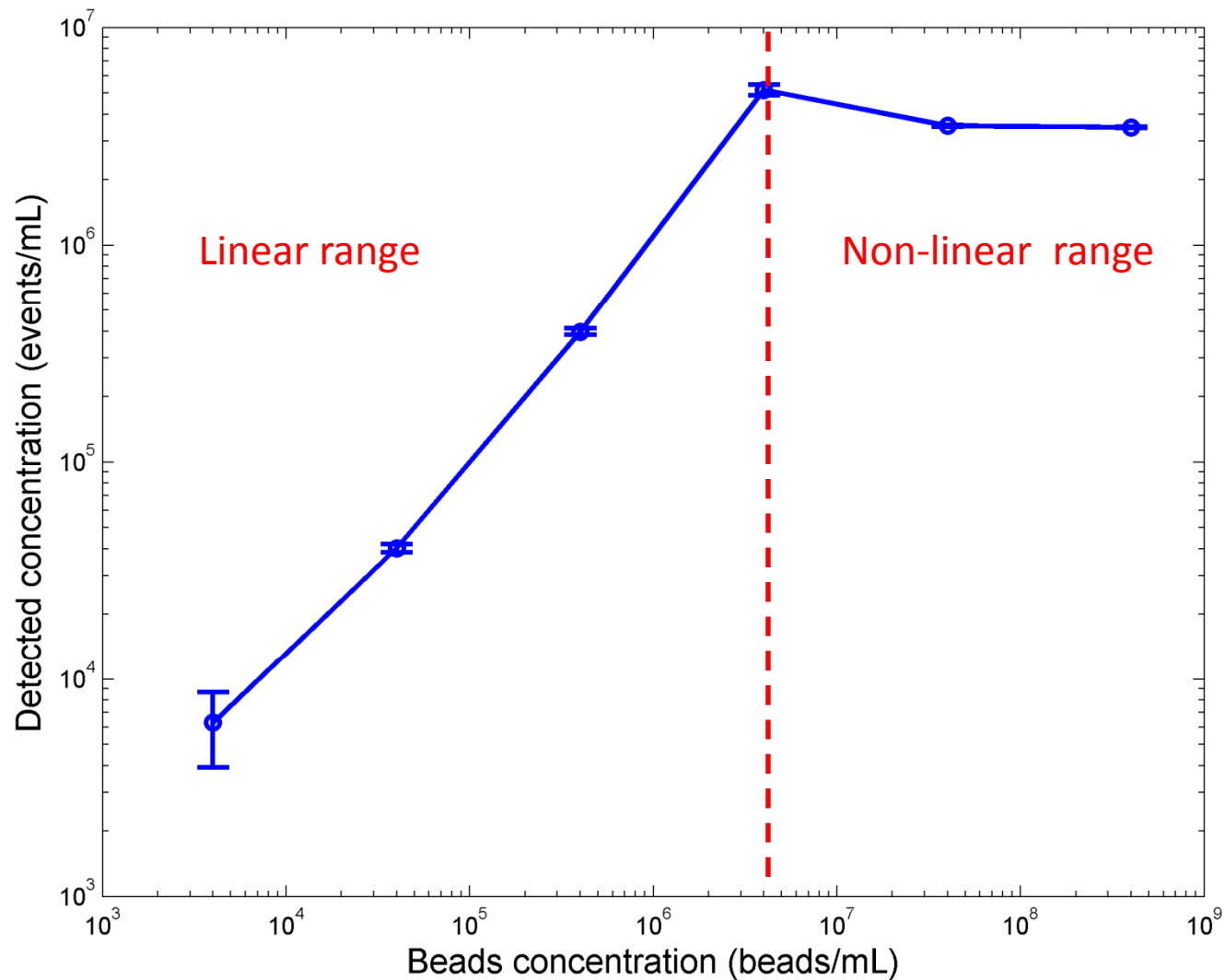
Réacteur hétérogène



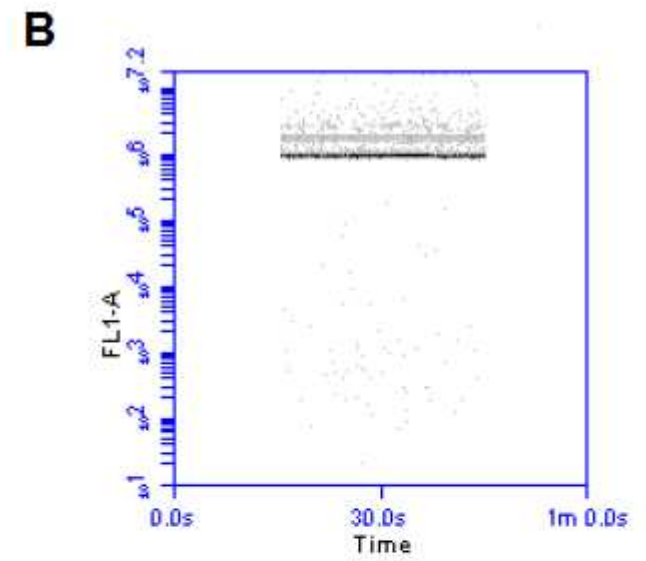
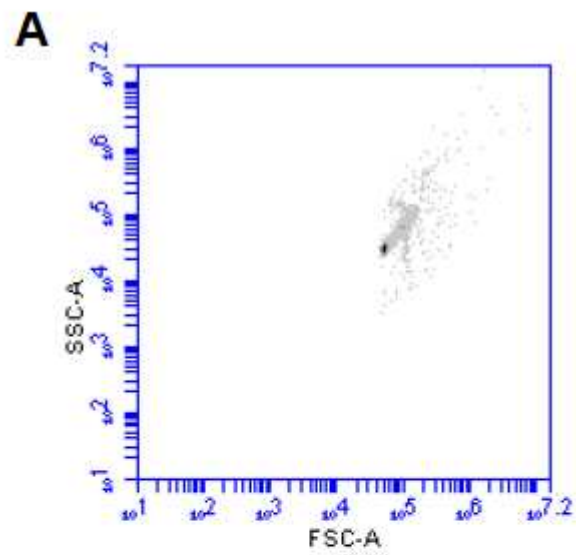
5. Mise en ligne de la cytométrie en flux au niveau des bioréacteurs



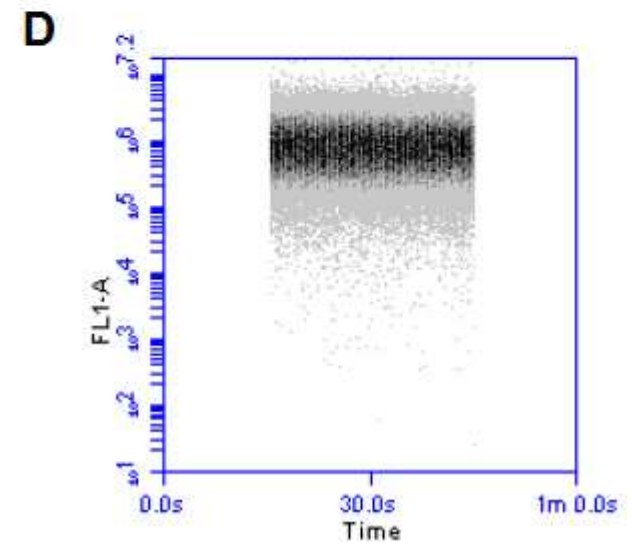
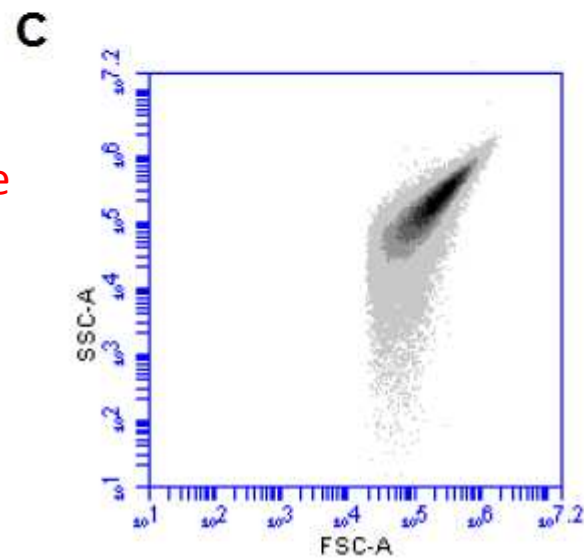
Première contrainte : dilution des échantillons (résolution acceptable si suspension cellulaire $< 3 \cdot 10^6$ particles/mL)



Gamme linéaire

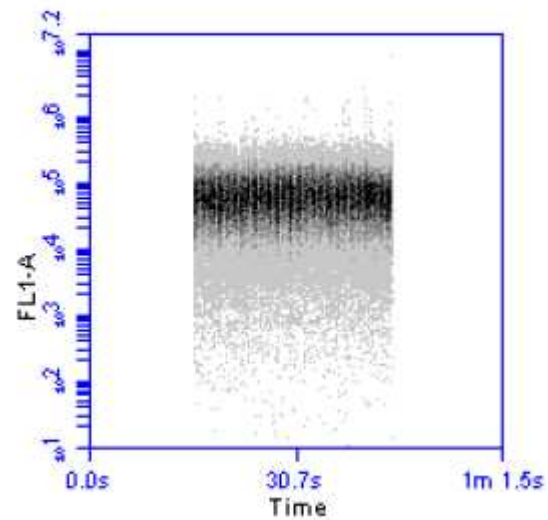


Gamme non linéaire

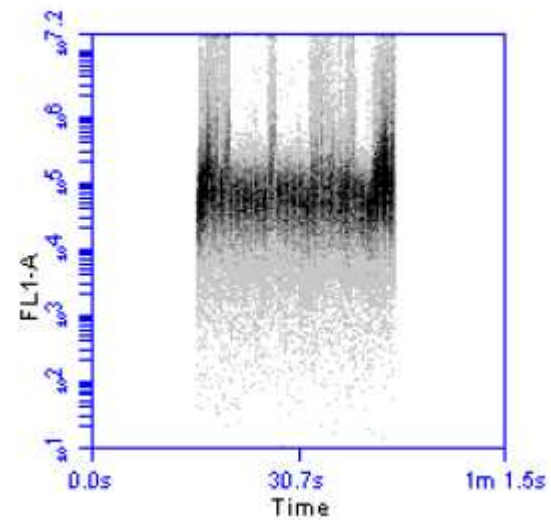


Deuxième contrainte : la prise d'échantillon doit s'effectuer à pression constante

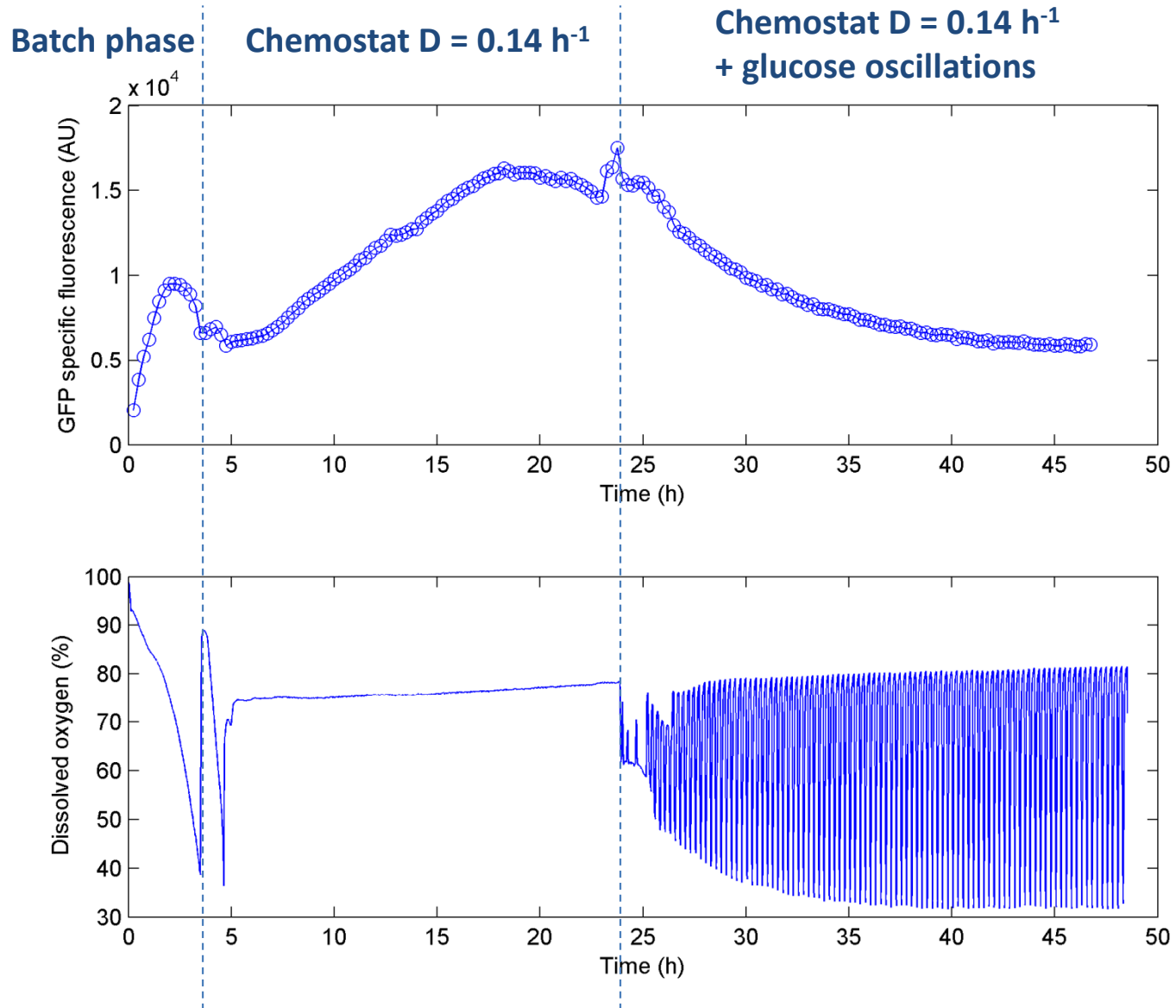
A Pression constante

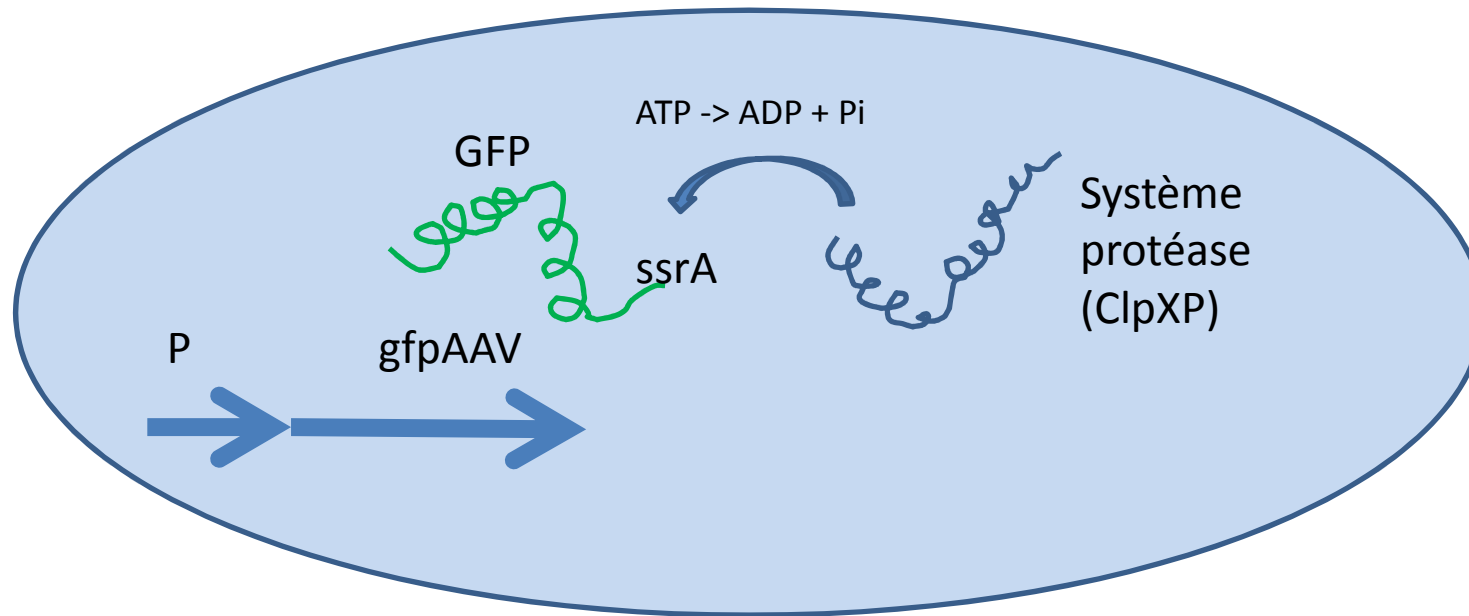


B Fluctuations de pression

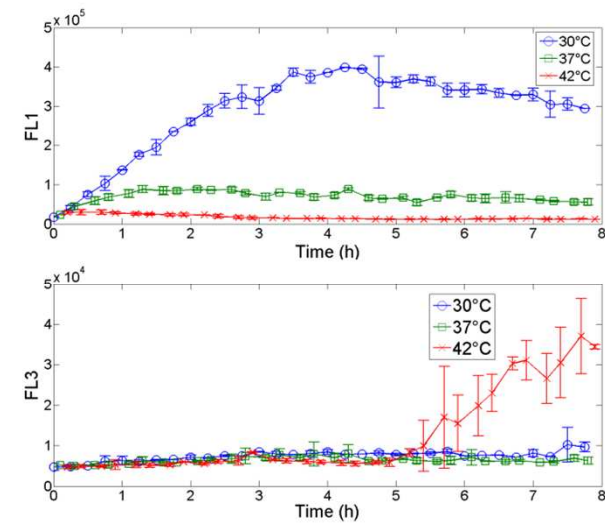
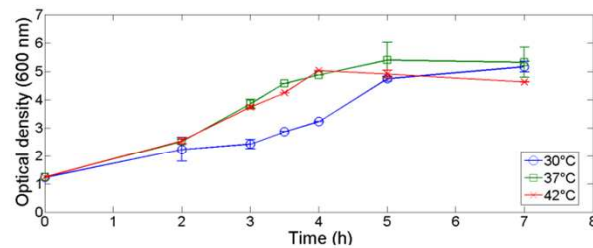


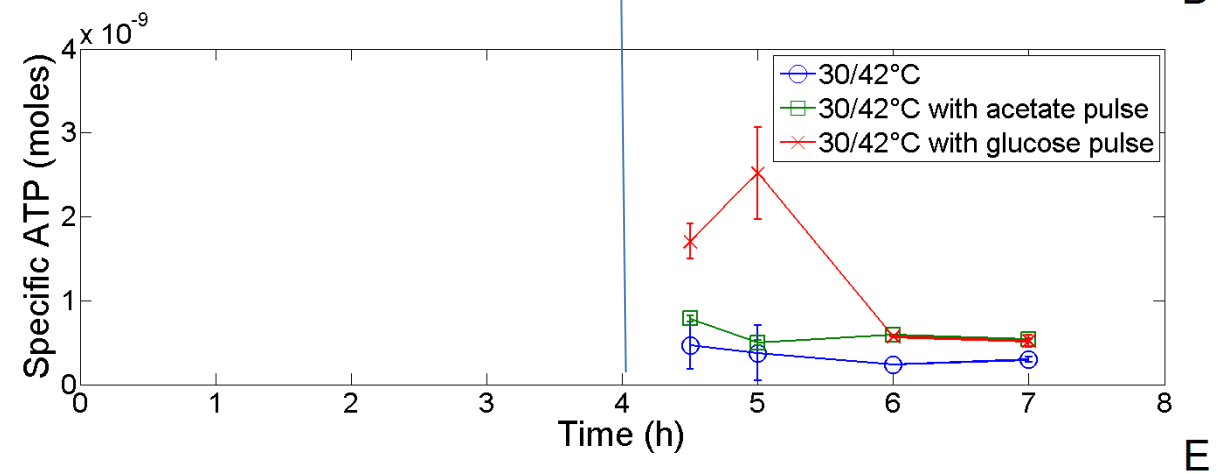
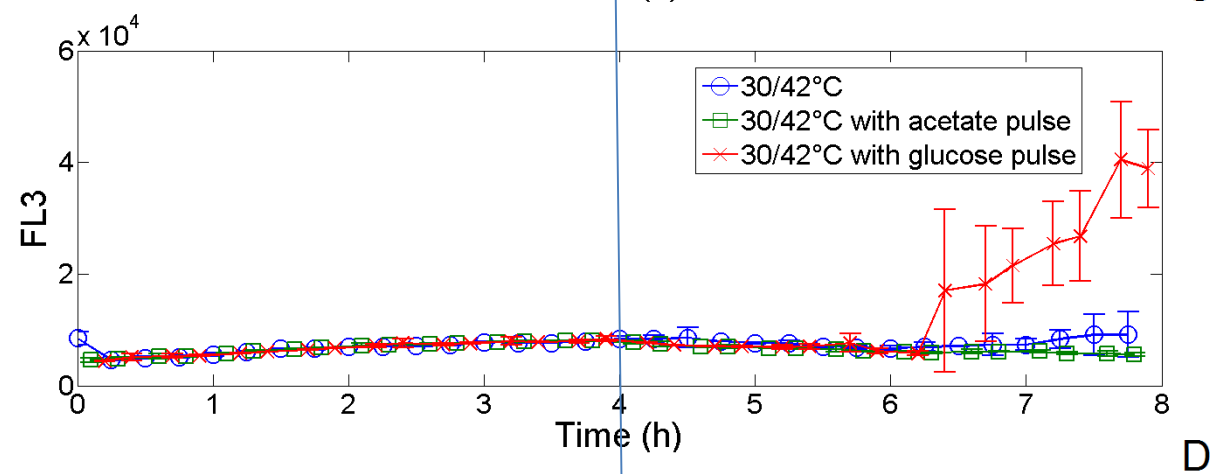
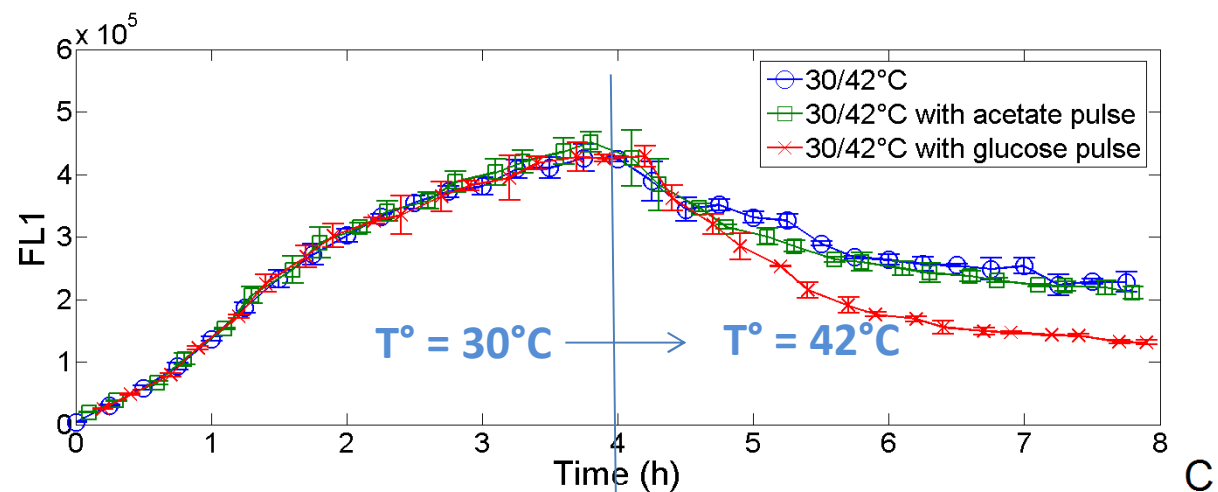
Expérience : culture de *E. coli* *pfis::gfpAAV* en chémostat



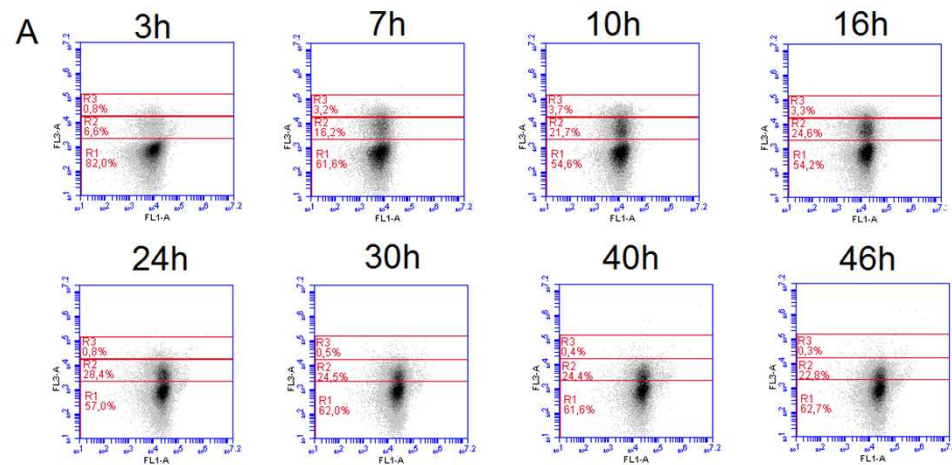


Utilisation en « multiplex » :

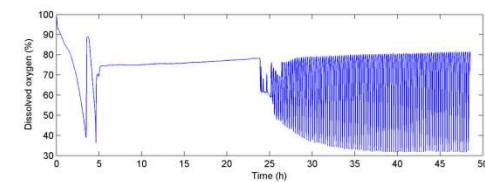
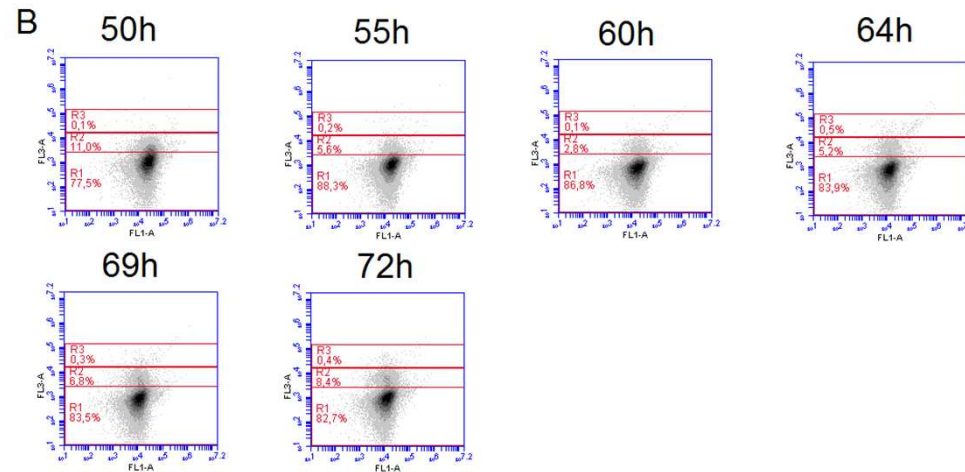
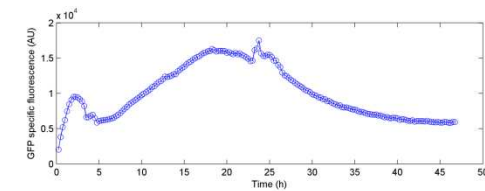




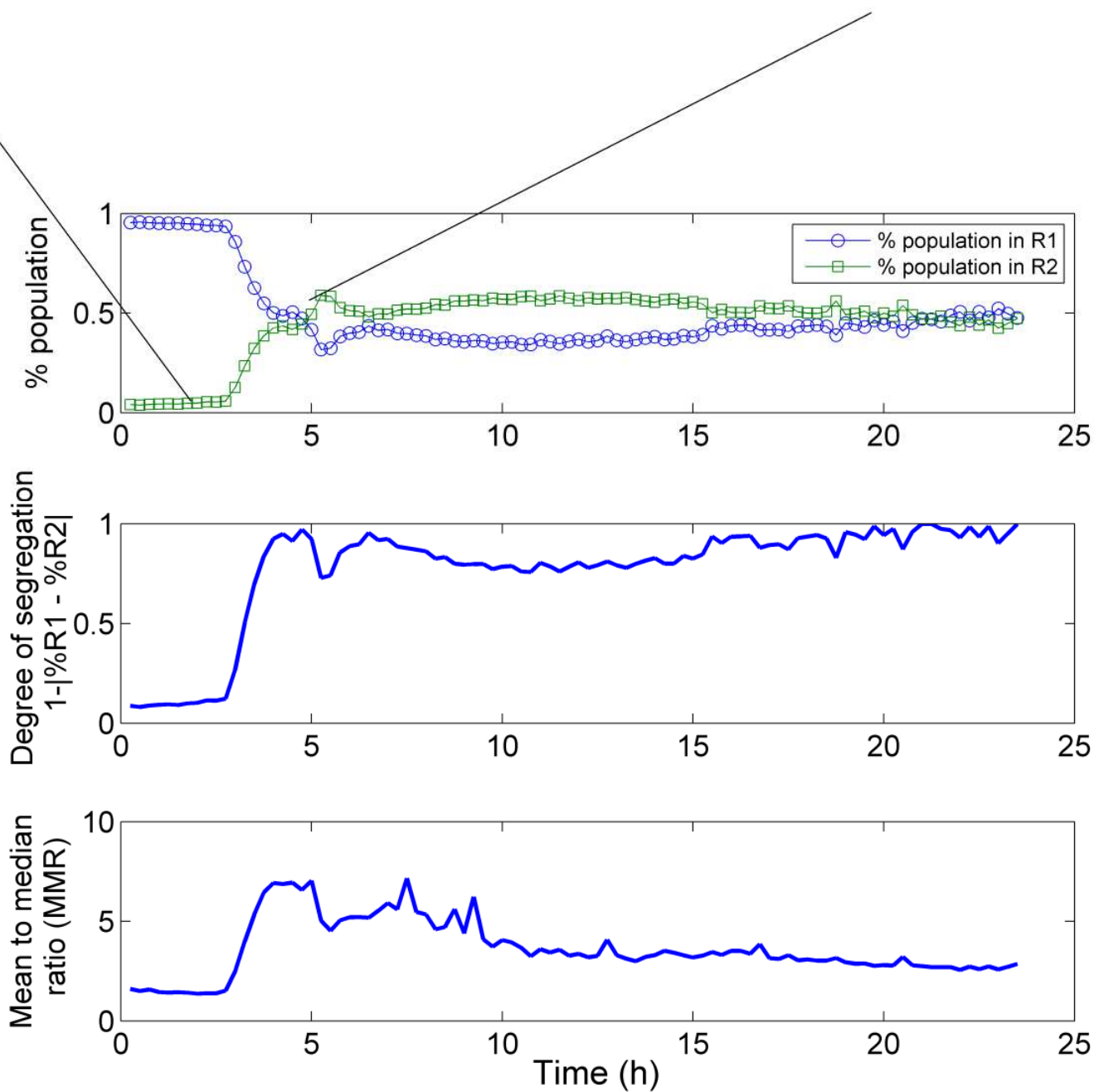
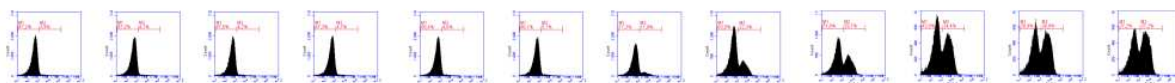
Comment « paramétrer » le degré d'hétérogénéité de ma population au cours d'une culture en bioréacteur ?



Phase de limitation
en substrat



Phase de fluctuation
en substrat



6. Conclusion

- La cytométrie en flux apporte des suivis pertinent en terme de procédé (viabilité, capacité de production, capacité à excréter)
- Les biomarqueurs doivent être sélectionnés avec soins

Perspective :

Incorporation de la cytométrie en flux dans les boucles de régulation des procédés

Nécessité :

- De mettre au point des biomarqueurs avec un temps de réponse correct
- De développer les interface logicielle de manière à incorporer directement les résultats de cytométrie au niveau des systèmes de contrôle

A microscopic image showing a dense population of cells, likely bacteria or yeast, that are fluorescently labeled. The cells appear as numerous bright green, elongated, rod-shaped structures against a dark background. They are distributed throughout the field of view, with some appearing in small clusters and others as individual cells.

Merci de votre attention